

令和元年5月24日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10913

研究課題名(和文) グリオスタチンのシグナルカスケード制御による関節リウマチ治療への応用

研究課題名(英文) Therapeutic strategy for rheumatoid arthritis with signal cascade control of gliostatin

研究代表者

小林 正明 (Kobayashi, Masaki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：20254287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、関節リウマチの病態形成にグリオスタチンが密接に関与していることを初めて見いだした。グリオスタチンのシグナルカスケード制御を関節リウマチ治療へ応用することを最終目標としている。

本研究ではグリオスタチンのシグナルカスケード制御因子の探索を行った。グリオスタチンプロモーター領域には7つのSp1結合領域があり、Sp1を阻害することによりグリオスタチンの発現は阻害された。そこでSp1転写因子阻害剤であるmithramycinを用いて、その波及効果を検討したところ、軟骨破壊を誘導するマトリックスメタロプロテアーゼ-1, 3, 9, 13が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチの治療はこの10年で劇的に進歩し、発症早期からの抗リウマチ薬、生物学的製剤、低分子シグナル伝達阻害剤の導入により、治療は寛解をめざすものになった。しかしながら未だいずれの治療にも反応しない薬剤耐性難治性患者や炎症が鎮静化されたにも関わらず骨びらの進行がみられる患者が存在する。

本研究によって、グリオスタチンが新たな治療標的となることが明らかとなった。グリオスタチンの抑制によって骨軟骨破壊に関与するマトリックスプロテアーゼが抑制することから、変形性関節症の進展抑制にも応用可能と考える。

研究成果の概要(英文)：We found for the first time that gliostatin is closely involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. In this study, the goal is to apply the signal cascade control of gliostatin to the treatment of rheumatoid arthritis.

We have searched for signal cascade regulators of gliostatin. There are seven Sp1 binding sites in the gliostatin promoter region, and the expression of gliostatin was inhibited by inhibiting Sp1. The knock-on effects were examined using mithramycin, which is an Sp1 transcription factor inhibitor. We also clarified that matrix metalloproteinases-1, 3, 9, 13 that induce cartilage destruction were suppressed by mithramycin.

研究分野：整形外科

キーワード：関節リウマチ 滑膜細胞 グリオスタチン マトリックスメタロプロテイナーゼ

1. 研究開始当初の背景

グリオスタチンは thymidine phosphorylase 酵素活性をもち、*in vivo*、*in vitro* において血管新生作用を有している。またラット大脳皮質のグリア細胞に対しては増殖阻害作用を、皮質ニューロンに対しては神経突起伸長および生存維持活性をもっている。thymidine phosphorylase は thymidine を thymine と deoxyribose-1-phosphate へと代謝するがこの酵素活性のみからグリオスタチンのもつ多彩な生物学的作用を説明することはできない。申請者らは、関節リウマチの発症に、グリオスタチンが密接に関与していることを初めて見いだした。すなわち、関節リウマチ患者の関節液中には高濃度にグリオスタチンが存在し、血清グリオスタチン濃度は関節リウマチの病勢も反映している。ウサギを用いた *in vivo* の実験系にて、グリオスタチンの関節内投与により関節リウマチ様の慢性滑膜炎と関節軟骨破壊が惹起された。関節リウマチ由来の培養滑膜細胞をグリオスタチンにて刺激すると血管新生作用をもつ蛋白質の遺伝子群の発現が誘導され、血管新生抑制作用をもつ蛋白質の遺伝子群の発現が抑制された。また炎症性サイトカインネットワークの上流のサイトカインである tumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-1 β によりグリオスタチンが誘導され、さらにグリオスタチンには autocrine 作用がある。そこで新しい治療標的となりうるグリオスタチンのシグナルカスケード制御を明らかにする計画を策定した。

2. 研究の目的

関節リウマチの治療はこの 10 年で劇的に進歩し、発症早期からの抗リウマチ薬、生物学的製剤、低分子シグナル伝達阻害剤の導入により、治療は寛解をめざすものになった。しかしながら未だにいずれの治療にも反応しない薬剤耐性難治性患者や炎症が鎮静化されたにも関わらず骨びらの進行がみられる患者が存在する。我々は、関節リウマチの病態形成にグリオスタチンが密接に関与していることを初めて見いだした。グリオスタチンは滑膜細胞、軟骨細胞にて関節リウマチに罹患した関節内で大量に産生される。動物実験から、グリオスタチンの関節内投与により関節リウマチに類似した慢性炎症が引き起こされ、パンヌス形成も確認された。本研究ではグリオスタチンのシグナルカスケード制御を関節リウマチ治療へ応用することを最終目標としている。

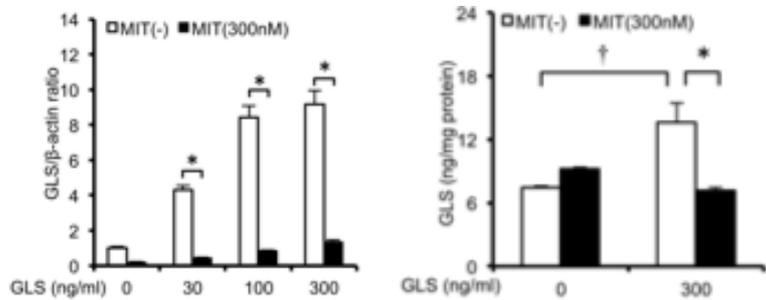
3. 研究の方法

関節リウマチ患者の人工関節全置換術または関節鏡下滑膜切除術時に採取した滑膜組織から培養した線維芽細胞様滑膜培養細胞 (**FLSs**)を用いて実験を行った。対象は **2010** 年関節リウマチ新診断基準を満たした患者 **13** 名で、人工関節置換術、滑膜切除術時に採取した滑膜組織を初代培養し、実験には **3** 代から **8** 代継代した **FLSs** を使用した。

グリオスタチンプロモーター領域には 7 つの Sp1 結合領域があり、Sp1 を阻害することによりグリオスタチンの発現は阻害される。本研究ではグリオスタチンのシグナルカスケード制御因子の探索を行うため、まずは制御因子の候補となりうる Sp1 転写因子阻害剤である mithramycin (MIT) あるいは、多数の炎症性サイトカインのシグナル伝達を阻害する tofacitinib に代表される janus kinase 阻害剤を用いて細胞を障害することなく、グリオスタチンを産生抑制可能な至適濃度を検討した。

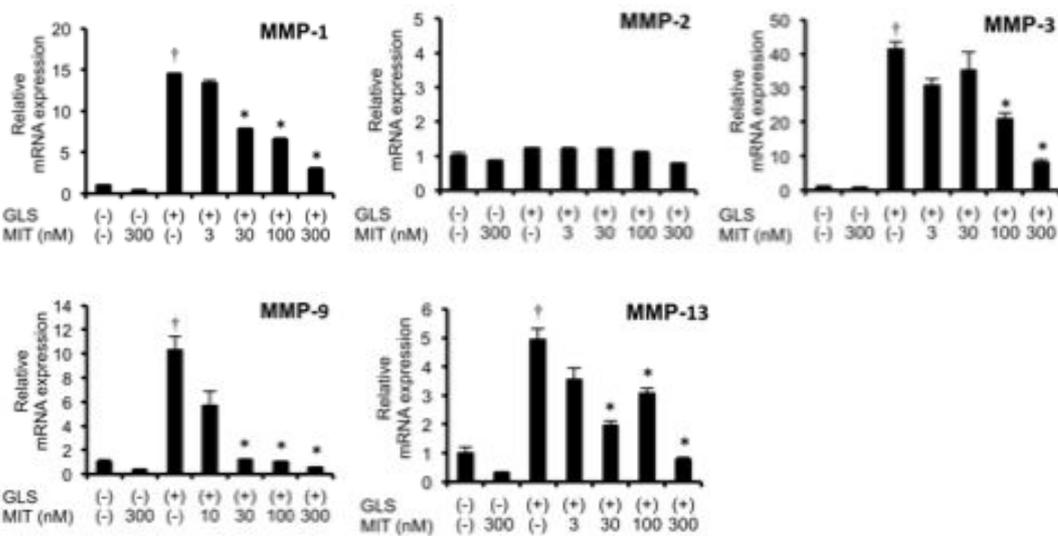
4. 研究成果

グリオスタチン autocrine 作用と **MIT** による抑制効果



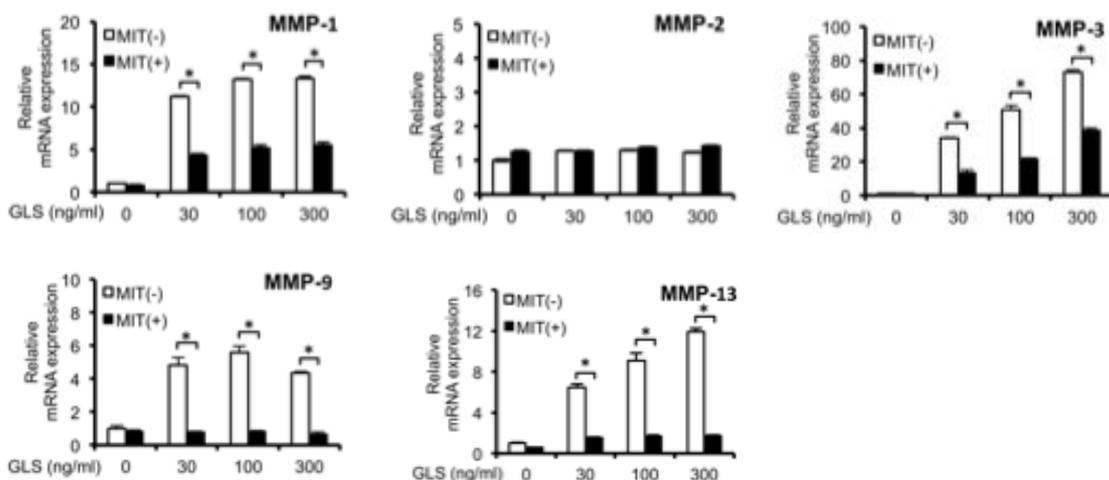
関節リウマチ患者の関節液中グリオスタチン濃度は平均約 300ng/ml である。この濃度を最大濃度として FLSs を刺激するとグリオスタチンは濃度依存的に誘導され、グリオスタチンの autocrine 作用が確認された。この発現は MIT により有意に抑制された。

グリオスタチン刺激によるマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP)-1, -2, -3, -9, -13 発現量の変化



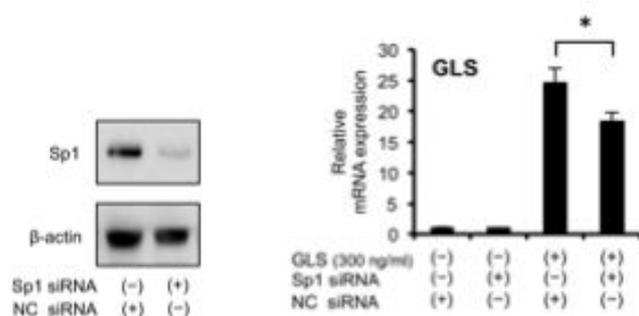
前述のグリオスタチン濃度(300ng/ml)にて FLSs を刺激し、MMP-1, -2, -3, -9, -13 の発現を RT PCR にて確認した。MMP-1, -3, -9, -13 はグリオスタチンにて有意な発現誘導を観察したが、MMP-2 は誘導されなかった。MMP-1, -3, -9, -13 の誘導は MIT により濃度依存性に有意に抑制された。

グリオスタチン刺激による MMPs の誘導に対する MIT の効果



グリオスタチン刺激による **MMPs** の誘導は、thymidine phosphorylase 酵素阻害剤によっては、抑制されない。

Sp1 RNA 干渉によってもたらされるグリオスタチン抑制効果



GLS と **MMP-1, -3, -13** タンパク量は **EIA** 法を用いて、**MMP-2, -9** タンパク量は **gelatin zymography** 法を用いて測定した。

siRNA を用いて **Sp1** 発現をノックダウンし **GLS** と **MMPs** 発現の変化を検討した。**GLS** 刺激によって **GLS** と **MMP-1, -3, -9, -13** 発現が有意に誘導された。また **GLS** によって誘導された **GLS** と **MMP-1, -3, -9, -13** 発現は **MIT** により有意に抑制されたが、**TPI** では抑制されなかった。**GLS** により核内 **Sp1** は有意に増加し、この核内 **Sp1** は **MIT** で有意に抑制された。**GLS** によって誘導された **GLS** は **Sp1 siRNA** を用いて有意に抑制されたが、**MMPs** 発現の抑制に有意差は認めなかった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Tatematsu N, Waguri-Nagaya Y, Kawaguchi Y, Ikuta K, Kobayashi M, Nozaki M, Asai K, Aoyama M, Otsuka T. Mithramycin has inhibitory effects of gliostatin and matrix metalloproteinases expression induced by gliostatin in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Mod Rheumatol* 2018;28:495-505. [査読あり]
2. Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Oguri Y, Nozaki M, Kobayashi M, Otsuka T. Septic spondylodiscitis due to non-typhoidal Salmonella in a patient with rheumatoid arthritis treated with a TNF inhibitor and methotrexate. *Modern Rheumatology Case Reports* 2018, DOI: 10.1080/24725625.2017.1417673. [査読あり]
3. Aiba H, Kobayashi M, Waguri-Nagaya Y, Goto H, Mizutani J, Yamada S, Okamoto H, Nozaki M, Mitsui H, Miwa S, Kobayashi M, Endo K, Saito S, Goto T, Otsuka T. Treatment of aneurysmal bone cysts using endoscopic curettage. *BMC Musculoskelet Disord.* 2018;19:268. doi: 10.1186/s12891-018-2176-6. [査読あり]
4. Aiba H, Kobayashi M, Waguri-Nagaya Y, Goto H, Mizutani J, Yamada S, Okamoto H, Nozaki M, Mitsui H, Miwa S, Kobayashi M, Endo K, Saito S, Goto T, Otsuka T. Treatment of simple bone cysts using endoscopic curettage: a case series analysis. *J Orthop Surg Res.* 2018;13:168. doi:10.1186/s13018-018-0869-z. [査読あり]
5. Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Oguri Y, Kobayashi M, Nozaki M, Asai K, Aoyama M, Otsuka T. The janus kinase inhibitor tofacitinib inhibits TNF α -induced gliostatin expression in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Clin Exp Rheumatol* 2018; 36: 559-567. [査読あり]
6. Ha M, Hibi Y, Kanazawa S, Fukuta T, Waguri-Nagaya Y, Wada I, Otsuka T, Okamoto T. Inhibition of IL-6 production from rheumatoid synovial fibroblasts by isoform-specific

- histone deacetylase (HDAC) inhibitor. Nagoya Med J 2018; 56: 39-52. [査読あり]
7. Murase A, Nozaki M, Kobayashi M, Goto H, Yasuma S, Takenaga T, Nagaya Y, Mizutani J, Okamoto H, Iguchi H, Otsuka T. Comparison of quantitative evaluation between cutaneous and transosseous inertial sensors in anterior cruciate ligament deficient knee: A cadaveric study. J Orthop Sci 2017;22:874-879. [査読あり]
 8. Goto Y, Aoyama M, Sekiya T, Waguri-Nagaya Y, Miyazawa K, Asai K, Goto S. CXCR4⁺CD45⁻ cells are niche forming for osteoclastogenesis via the SDF-1, CXCL7, and CX3CL1 signaling pathways in bone marrow. Stem Cells. 2016;34:2733-2743.

[学会発表](計 23 件)

1. Kawaguchi Y, Oguri Y, Nozaki M, Asai K, Waguri-Nagaya Y. Novel anti-angiogenic effects of tofacitinib in fibroblast-like synoviocytes derived from patients with RA. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) 2019, 2019.6.12-15, IFEMA'S Convention and Congress Centres (Madrid, Spain)
2. Joyo Y, Kawaguchi Y, Oguri Y, Nozaki M, Asai K, Waguri-Nagaya Y. The JAK inhibitor (baricitinib) inhibits IFN γ -induced gliostatin expression in human fibroblast-like synoviocytes. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) 2019, 2019.6.12-15, IFEMA'S Convention and Congress Centres (Madrid, Spain)
3. Kuroyanagi G, Asai K, Waguri-Nagaya Y, Yamaguchi R, Harry K. Interleukin-6 receptor blocker increases revascularization and new bone formation in murine model of ischemic osteonecrosis. The 63rd Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology. 2019/04/17. 2019.4.15-2019.4.17
4. Kawaguchi Y, Oguri Y, Nozaki M, Asai K, Waguri-Nagaya Y. Serum GLS levels were significantly decreased in patients with RA who were treated with tofacitinib. 39th SICOT Orthopaedic World Congress 2018, 2018.10.10-13, Montréal Convention Centre, (Montreal, Canada)
5. Oguri Y, Kawaguchi Y, Nozaki M, Asai K, Waguri-Nagaya Y. Circulating gliostatin correlates with serological feature and response to IL-6 inhibitor therapy in patients with RA. 39th SICOT Orthopaedic World Congress 2018, 2018.10.10-13, Montréal Convention Centre, (Montreal, Canada)
6. Ikuta K, Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Kobayashi M, Goto H, Nozaki M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. The inhibitory effects of tacrolimus on gliostatin production in RA synoviocytes. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2017), 2017.6.14-17, IFEMA's Convention and Congress Centres (Madrid, Spain).
7. Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Tatematsu N, Kobayashi M, Goto H, Nozaki M, Ikuta K, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. The JAK inhibitor (Tofacitinib) inhibits TNF-induced gliostatin/thymidine phosphorylase expression in human fibroblast-like synoviocytes. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2016), 2016.6.8-11, ExCel London (London, United Kingdom)
8. Ikuta K, Waguri-Nagaya Y, Kawaguchi Y, Tatematsu N, Kobayashi M, Goto H, Nozaki M,

- Aoyama M, Asai K, Otsuka T. Sp1 interference prevents joint destruction of RA through inhibitory effects of gliostatin and matrix metalloproteinase-3. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2016), 2016.6.8-11, ExCel London (London, United Kingdom)
9. Tatematsu N, Waguri-Nagaya Y, Kawaguchi Y, Ikuta K, Kobayashi M, Goto H, Nozaki M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. Sp1 inhibitor modulates the autocrine action of gliostatin/thymidine phosphorylase (GLS/TYMP) in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2016), 2016.6.8-11, ExCel London (London, United Kingdom)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名： 永谷 祐子

ローマ字氏名： Yuko Nagaya

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：90291583

研究分担者氏名： 浅井 清文

ローマ字氏名： Kiyofumi Asai

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：70212462

(2) 研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。